

白立鼎,陈银潇,李兆栋,等. 肠上皮细胞 *Tlr4* 特异性敲除基因鼠鉴定及免疫学特征观察 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 733-741.

Bai LD, Chen YX, Li ZD, et al. Identification and immunological characterization of intestinal epithelial cell-specific *Tlr4* gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 733-741.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.001

肠上皮细胞 *Tlr4* 特异性敲除基因鼠鉴定及免疫学特征观察

白立鼎,陈银潇,李兆栋,李佳颖,樊亚东,张晓雨,张翟轶,边育红,王相玲,
刘建卫,赵舒武*

(天津中医药大学,天津 301617)

【摘要】 目的 鉴定肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除 (*Tlr4*^{fl} cre T) 鼠,评价其免疫学特征。**方法** 应用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Tlr4*^{fl} cre T 基因鼠,PCR 和免疫荧光鉴定 *Tlr4*^{fl} cre T 基因鼠基因型,观察基因鼠的一般生物学特征、繁殖能力和子代存活率。HE 染色、流式细胞术及 ELISA 比较基因鼠和野生型小鼠免疫器官结构、肠黏膜免疫细胞比例及细胞因子分泌水平差异。**结果** 从基因和蛋白水平验证 *Tlr4*^{fl} cre T 基因鼠的建立。与野生型鼠比,*Tlr4*^{fl} cre T 基因鼠的一般生物学特征无明显差异、子代存活率 > 90%;胸腺、脾及肝生理结构无显著性差异;脾淋巴细胞增殖能力、血清及肠黏膜细胞因子分泌水平无显著性差异;但 CD4⁺T 和 $\gamma\delta$ T 细胞显著减少。**结论** 成功构建了肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除小鼠 (*Tlr4*^{fl} cre T),为研究肠上皮 *Tlr4* 基因在肠道疾病、肿瘤及代谢性疾病中的作用提供实验手段。

【关键词】 *Tlr4* 基因;肠黏膜;CRISPR/Cas9;Cre/Loxp;基因敲除

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0733-09

Identification and immunological characterization of intestinal epithelial cell-specific *Tlr4* gene knockout mice

BAI Liding, CHEN Yinxiao, LI Zhaodong, LI Jiaying, FAN Yadong, ZHANG Xiaoyu, ZHANG Zhaiyi, BIAN Yuhong,
WANG Xiangling, LIU Jianwei, ZHAO Shuwu*

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

Corresponding author: ZHAO Shuwu. E-mail: zhao_shuwu@126.com

【Abstract】 Objective To study the role of intestinal epithelial *Tlr4* in systemic immune effects by establishing a mouse model of conditional *Tlr4* knockout in intestinal epithelia. **Methods** Intestinal epithelial cell-specific *Tlr4* gene knockout mice (*Tlr4*^{fl} Cre T) were established by CRISPR/Cas9 technology. The genotype of *Tlr4*^{fl} Cre T mice was identified by PCR and immunofluorescence. The general biological characteristics, reproductive capacity, and offspring survival rate were also investigated. Differences in immune organ structures, the intestinal mucosal immune cell ratio, and cytokine secretion levels between wildtype and *Tlr4*^{fl} Cre T mice were compared by HE staining, flow cytometry, and ELISAs. **Results** Establishment of *Tlr4*^{fl} Cre T mice was verified at gene and protein levels. Compared with wildtype mice, *Tlr4*^{fl} Cre T mice had no significant difference in general biological characteristics and offspring survival rate of > 90%. No significant differences in the physiological structure of the thymus, spleen, or liver, proliferation of splenic

[基金项目] 国家自然科学基金(81873100)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81873100).

[作者简介] 白立鼎(1994—),男,在读硕士研究生,研究方向:中医药抗肿瘤。Email:1127168004@qq.com

[通信作者] 赵舒武(1971—),女,教授,博士,研究方向:中医治则与方药的机理研究。Email:zhao_shuwu@126.com

lymphocytes, and serum cytokine level, and intestinal mucosa were found between the two groups. However, the number of CD4⁺ T and $\gamma\delta$ T cells appeared to be significantly low in *Tlr4*^{fl/fl} Cre T mice. **Conclusions** The intestinal epithelial cell-specific *Tlr4* gene knockout mouse model was successfully established, which provides the experimental means to study the regulatory roles of *Tlr4* expression of intestinal epithelial cells in diseases.

【Keywords】 *Tlr4* gene; intestinal mucosal; CRISPR/Cas9; Cre/Loxp; gene knockout

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Tlr4 (toll-like receptor 4, TLR4) 基因位于 9 号染色体(9q32-q33)上,是由 4 个外显子和 3 个内含子组成的模式识别受体^[1]。TLR4 既可被外源性脂多糖激活,也可识别内源性配体,如高迁移率族蛋白 B1、热休克蛋白等,引起下游信号通路的激活,分泌细胞因子,发挥免疫调节作用^[2]。TLR4 广泛表达于多种免疫细胞及上皮细胞中,其中肠上皮细胞的 TLR4 可“感受”肠道微生态变化,具有调节和维持肠黏膜局部和机体的免疫稳态的重要作用^[3]。

肠上皮细胞持续暴露于肠道微生态,生理状态下,肠上皮 TLR4 表达较低以耐受肠道菌群,避免过度免疫反应引起肠道的损伤^[4]。一旦菌群失调或者其他因素导致肠上皮 TLR4 信号通路异常激活,就会导致多种肠道疾病的发生,如肠易激综合征^[5]、克罗恩病^[6]、胃肠道肿瘤等^[7]。肠上皮 TLR4 的异常表达甚至参与机体其他系统疾病的发生发展,如心脑血管疾病等^[8]。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建 *Tlr4*^{fl/fl} cre T 基因鼠,同时评价该基因鼠的一般生物学特征,进一步从大体形态-组织学结构-细胞-细胞因子层面较全面评价 *Tlr4*^{fl/fl} cre T 基因鼠的免疫学特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 野生型小鼠,每组小鼠均为雌、雄各 3 只,6 周龄,体重约为 20 g,购自北京维通利华公司【SCXK(京)2021-0006】。SPF 级 *Tlr4*^{fl/fl} cre W 及 *Tlr4*^{fl/fl} cre T 小鼠,遗传背景 BALB/cJGpt,每组小鼠均为雌、雄各 3 只,6 周龄,体重约为 20 g。购自江苏集萃药康生物科技有限公司【SCXK(苏)2018-0008】。饲养环境:小鼠于屏障环境饲养,自由饮水,环境温度 20 ~ 26℃,湿度 40% ~ 70%,光照/昼夜 12 h 交替。实验动物饲养于天津中医药大学实验动物中心【SYXK(津)2020-0005】。所有操作均符合天津中医药大学实验动物伦理学要求(TCM-LAEC2020074)。

1.1.2 主要试剂与仪器

PCR 扩增试剂(上海翌圣公司);TLR4 抗体(贝茵莱生物科技有限公司);CK-18(博奥森生物技术有限公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记山羊抗兔 IgG、Alexa Fluor 647 标记山羊抗小鼠 IgG(上海翌圣生物科技股份有限公司);琼脂糖、小鼠组织淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司);免疫细胞表型鉴定试剂:别藻青蛋白(Allophycocyanin, APC)标记的抗 CD8 抗体(CD8-APC)、CD49-APC、CD11b-FITC、CD4-FITC、TCR $\gamma\delta$ -FITC、CD11c-FITC、Guava 流式细胞仪(Guava flow cytometry, Millipore 公司,美国);ELISA 检测试剂盒(杭州联科生物有限公司)。目的基因 loxP、Cre 上、下游引物由江苏集萃药康公司设计,上海生工生物工程技术有限公司,loxP 基因(扩增片段 294 bp):上游引物 *Tlr4*-5wt-tF1 5'-CACAGTAAAGTTCGTAACCTTTGG-3';下游引物 *Tlr4*-5wt-tR1 5'-AATTGCTGTGCTATTGCTTGGG-3', Cre 基因(扩增片段长度 567 bp):上游引物: Vill1-ProF1 5'-GTGTTTGGTTTGTTTCCTCTGCATAAGA-3';下游引物: Cre5R1 5'-GCAGGCCAAATTTTGGTGTACGGTCA-3'。XR+型凝胶成像仪(Molecular Imager Gel Doc XR+ system, BIO-RAD 公司,美国);Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(Full wavelength multi-function microplate reader, Thermo 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 *Tlr4*^{fl/fl} cre T 鼠的构建及繁育

根据 CRISPR/Cas9 技术原理,将 sgRNA、Cas9 蛋白和打靶载体显微注射到小鼠受精卵,经胚胎移植,获得阳性 F0 代小鼠,阳性 F0 代小鼠与野生型小鼠配繁得到 F1 代(*Tlr4*^{fllox/-})杂合子小鼠。将 *Tlr4*^{fllox/-} 小鼠自交获得 *Tlr4*^{fllox/fllox} 小鼠,将 *Tlr4*^{fllox/fllox} 小鼠与 Provilii-Cre T 小鼠交配,筛选出子代基因型 *Tlr4*^{fllox/-}/ProCre^{+/-} 小鼠,将其与 *Tlr4*^{fllox/fllox} 配繁,获得子代基因型 *Tlr4*^{fl/fl} cre T 和 *Tlr4*^{fl/fl} cre W 小鼠。

1.2.2 PCR 技术鉴定小鼠的基因型

无菌剪取鼠耳(1 × 1 mm²),采用酶裂解法

55℃裂解 12 h(蛋白酶 K 终浓度 20 mg/mL),乙醇沉淀法提取小鼠基因组 DNA,以所得 DNA 为模板进行 PCR 扩增,50 μ L 反应体系如下:2 $\times$ Hieff PCR Master Mix 25 μ L、上游引物(10 μ mol/L)2 μ L、下游引物(10 μ mol/L)2 μ L、模板 DNA 5 μ L、去离子水补足至 50 μ L。反应条件:94℃ 3 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,共 40 个循环;72℃ 10 min。使用 1%琼脂糖凝胶与核酸染料对 PCR 扩增产物进行可视化,在凝胶成像仪中观察结果并拍照。

1.2.3 免疫荧光鉴定肠上皮 TLR4 蛋白表达

取 5 μ m 厚的小肠冰冻切片,室温 5%山羊血清封闭 1 h,一抗 TLR4(1:500)、CK-18(1:500),4℃孵育过夜。次日切片复温,荧光二抗 FITC(1:100) Alexa Fluor 647(1:400)孵育 0.5 h, PBS 冲洗, DAPI 复染,荧光显微镜观察并拍照。

1.2.4 免疫器官组织形态学观察

脱颈处死小鼠,立即切取脾、肝和胸腺(各 5 $\times$ 5 mm²)4%多聚甲醛中固定,24 h 换固定液 1 次,固定 48 h,脱水、透明、石蜡包埋,切片厚度 5 μ m。HE 染色,光学显微镜下观察拍照。

1.2.5 脾淋巴细胞增殖实验

脱颈处死小鼠,研磨脾,淋巴细胞分离试剂盒分离脾淋巴细胞,每毫升 5 $\times$ 10⁶ 个淋巴细胞悬液接种 96 孔培养板,加入 5 μ g/mL 刀豆蛋白,培养 48 h 后, CCK-8 检测淋巴细胞的增殖。刺激指数(SI)计算公式为:SI = (OD₄₅₀ 刺激 - OD₄₅₀ 对照) / (OD₄₅₀ 未刺激 - OD₄₅₀ 对照)^[9]。

1.2.6 流式细胞术检测肠黏膜免疫细胞

脱颈处死小鼠,分离小肠,纵向剖开冲洗,剪成 1 ~ 2 cm 小段,于含 EDTA 和 DTT 的裂解液充分裂解(37℃、200 r/min 摇床 20 min,3 次),40 μ m 滤网过滤裂解液, Percoll 梯度离心法分离滤液,小心吸取中间乳白色细胞层, PBS 清洗,每 1.5 mL EP 管中 1 $\times$ 10⁶ 个细胞,分别加入荧光基因标记的抗体,4℃避光孵育 30 min, PBS 洗涤细胞,1 mL PBS 重悬细胞,避光,流式细胞仪进行检测^[10]。

1.2.7 ELISA 技术检测血清和肠黏膜细胞因子水平

目内眦采血并收集血液,4℃静置 4 h,4000 r/min,离心 10 min,得到血清,分装并保存于 -80℃待测。脱颈处死小鼠,分离小肠,纵向剖开,生理盐水漂洗,吸水纸吸取多余水分,刮取黏膜、匀

浆,匀浆液分装保存于 -80℃待测。按照 ELISA 检测试剂盒流程操作,测量酶标仪 450 nm 吸光度(OD)值,按照公式计算细胞因子的含量。

1.3 统计学分析

所有数据均用 Graph Pad Prism 5 和 SPSS 17.0 软件处理,两组间数据比较使用独立样本 *t* 检验,多组间数据比较使用单因素 ANOVA 分析。*P* < 0.05 表示具有统计学意义。

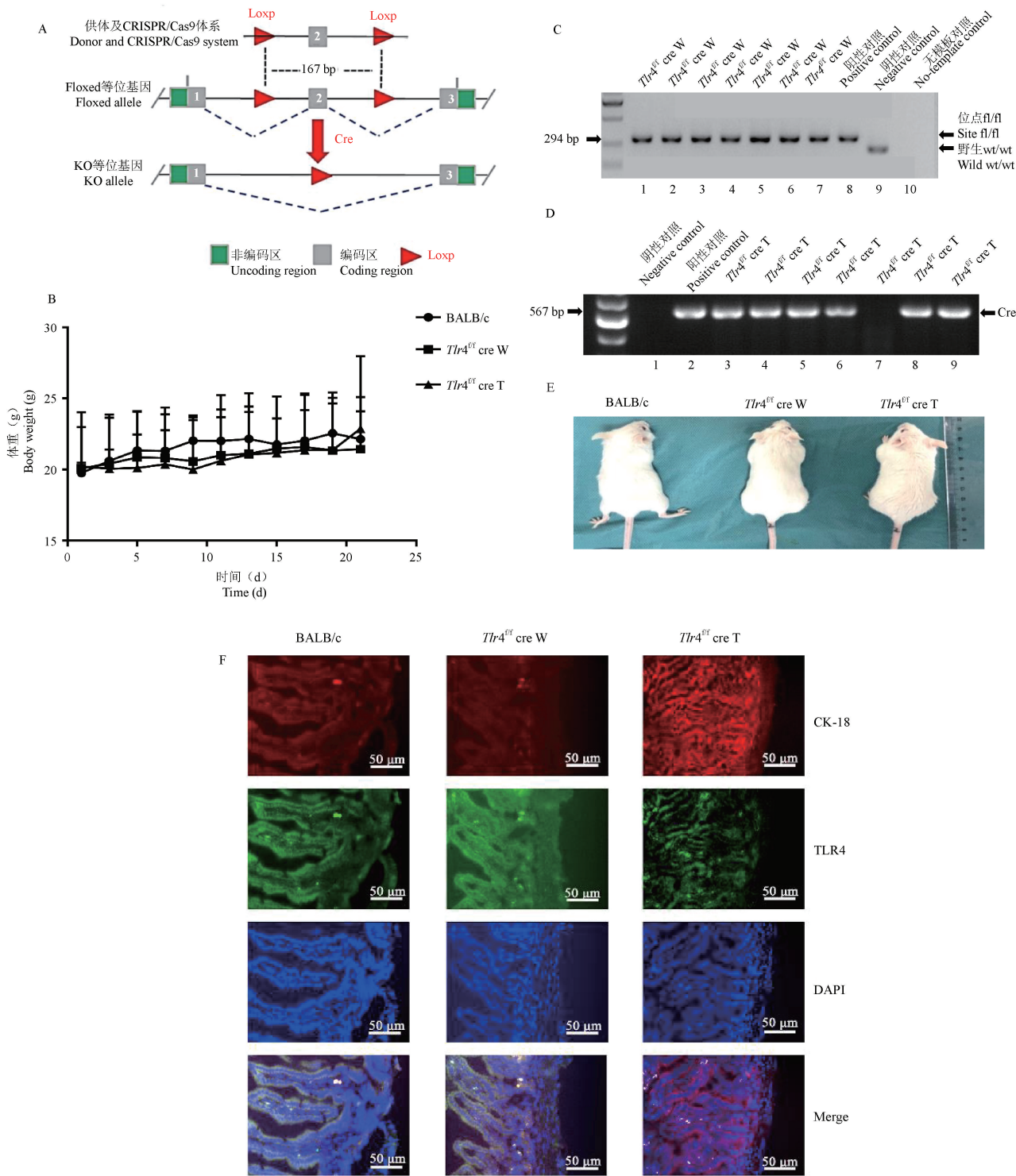
2 结果

2.1 *Tlr4*^{flx/flx} cre T 鼠的构建及一般生物学特征观察

Tlr4^{flx/flx} 基因小鼠是在 *Tlr4* 基因 2 号外显子(167 bp)两端插入 Loxp 位点(图 1A),1 ~ 7 号泳道内检测的结果为 *Tlr4*^{flx/flx} 小鼠,8 号泳道检测结果为野生型小鼠(图 1C)。与表达 Cre 的转基因小鼠交配,从而获得 Cre 重组酶切除肠上皮 *Tlr4* 基因的条件敲除小鼠。雄性 *Tlr4*^{flx/-}/Pro Cre⁺ 小鼠与雄性 *Tlr4*^{flx/flx} 小鼠杂交后代进行基因鉴定,2 ~ 6,8 ~ 9 号泳道内检测的结果为 *Tlr4*^{flx/flx}/ProCre⁺ 小鼠(图 1D),即肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除(*Tlr4*^{flx/flx} cre T)鼠。免疫荧光双染结果显示:与 BALB/c 组相比,*Tlr4*^{flx/flx} cre W 鼠肠上皮 TLR4 荧光强度无减弱,而 *Tlr4*^{flx/flx} cre T 鼠肠上皮 TLR4 荧光强度显著减弱(图 1F)。*Tlr4*^{flx/flx} cre T 鼠生长发育良好,毛发柔顺有光泽,身长及体重等未表现出区别于 BALB/c 野生型鼠的差异(图 1B,1E)。*Tlr4*^{flx/flx} cre T 母鼠每胎产 8 ~ 10 只幼鼠,幼鼠成活率 > 90%。6 周龄 *Tlr4*^{flx/flx} cre T 鼠与 BALB/c 鼠相比每日饮水、饮食和体重无明显差异。*Tlr4*^{flx/flx} cre T 鼠的构建策略及鉴定结果合格,基因特异性敲除对一般生物学特征无显著影响。

2.2 *Tlr4*^{flx/flx} cre T 鼠主要免疫器官的组织学分析

与 BALB/c 鼠比,*Tlr4*^{flx/flx} cre W 及 *Tlr4*^{flx/flx} cre T 鼠的胸腺、脾及肝的大体形态均未见异常变化,各脏器指数均无显著性差异(图 2A,2B,2C)。*Tlr4*^{flx/flx} cre W 及 *Tlr4*^{flx/flx} cre T 鼠上述 3 个器官的 HE 染色光镜下的形态结构未见异常改变:胸腺内有明确的皮质和髓质、且皮质/髓质无异常改变(图 2D),脾的切面可见白髓和红髓结构、且两者比例正常(图 2E),肝的肝小叶呈多边形,其中央可见中央静脉,围绕中央静脉是迷路样肝索以及肝血窦(图 2F),肝小叶之间可见有门管区。

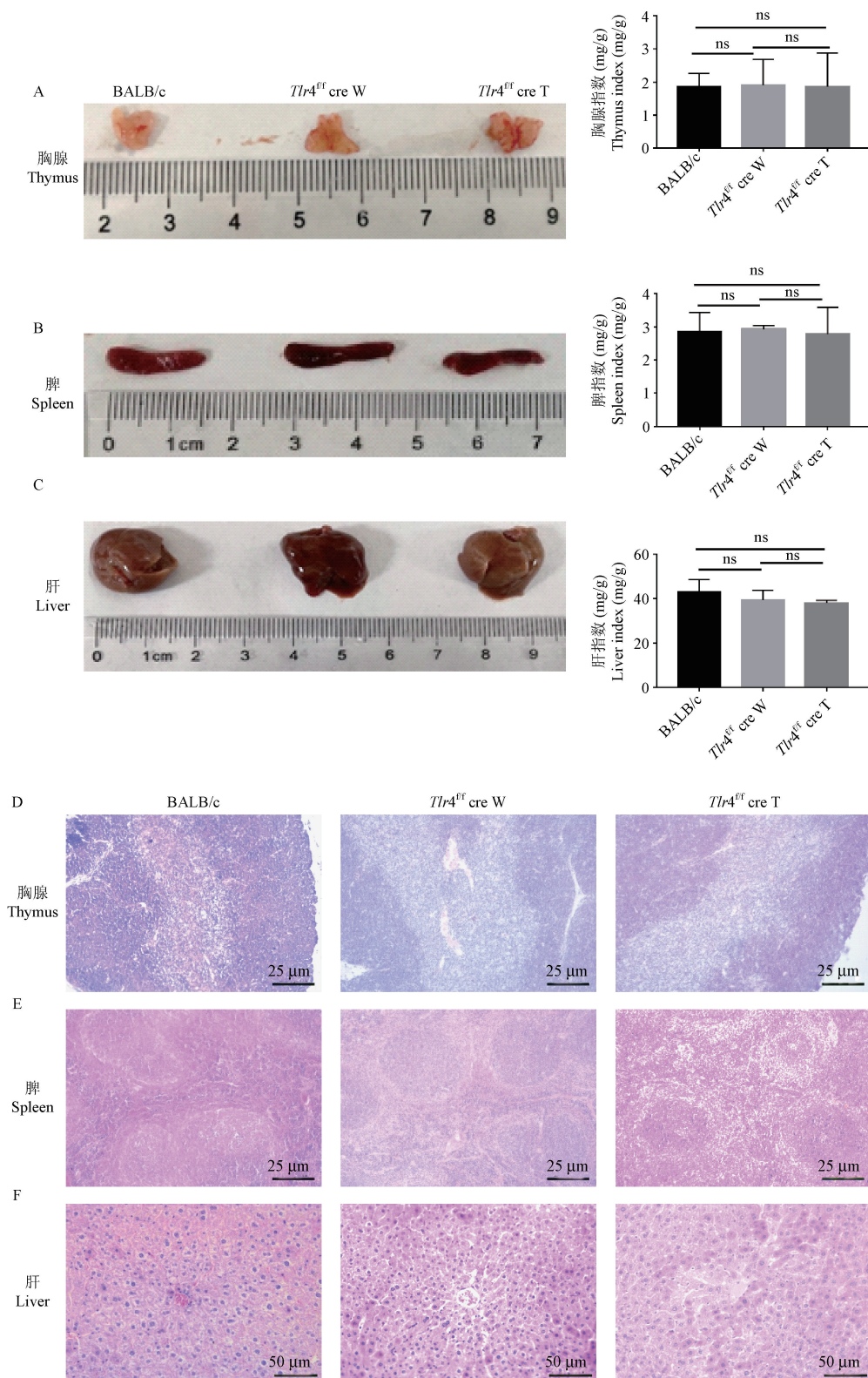


注:A: *Tlr4^{fl/fl}* cre T 鼠的构建策略与流程图;B: 小鼠体重;C, D: 小鼠耳组织 DNA 经 PCR 扩增后电泳条带;E: 小鼠外形体征;F: 小鼠肠上皮 TLR4 免疫荧光图。

图 1 *Tlr4^{fl/fl}* cre T 鼠的构建策略及鉴定结果

Note. A. Strategy and flow chart of *Tlr4^{fl/fl}* cre T mice. B. Mice weight. C, D. Electrophoresis band of PCR amplification of mice ear tissue DNA. E. Appearance and signs of mice. F. Intestinal epithelium TLR4 immunofluorescence.

Figure 1 Strategy and identification of *Tlr4^{fl/fl}* cre T mice



注:A,B,C:胸腺、脾、肝外形特征及指数;D,E,F:胸腺、脾、肝结构 HE 染色。

图 2 *Tlr4^{eff} cre T* 鼠主要免疫器官的形态学观察

Note. A, B, C. Thymus, spleen, liver profile and index. D, E, F. Thymus, spleen, liver tissue in the HE stained histopathological images.

Figure 2 Morphology observation of the main organs of *Tlr4^{eff} cre T* mice

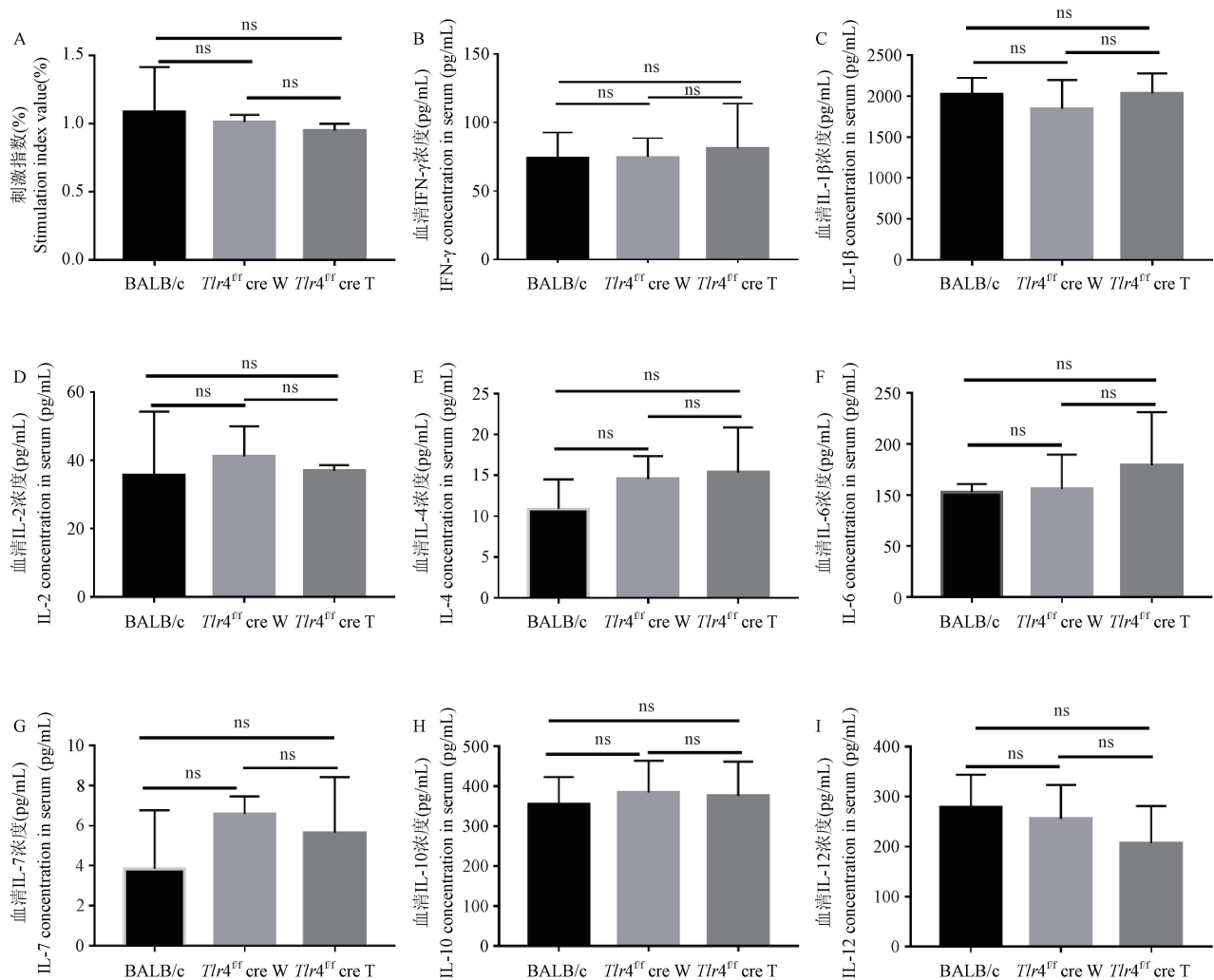
2.3 肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对脾淋巴细胞增殖及血清细胞因子的影响

与 BALB/c 鼠相比, *Tlr4*^{fl/fl} cre W 和 *Tlr4*^{fl/fl} cre T 鼠的脾淋巴细胞刺激指数均无明显差异, 提示小鼠肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对脾淋巴细胞增殖活性无显著影响(图 3A)。与 BALB/c 鼠比, *Tlr4*^{fl/fl} cre W 和 *Tlr4*^{fl/fl} cre T 鼠血清因子如 IFN- γ (图 3B)、IL-1 β (图 3C)、IL-2(图 3D)、IL-4(图 3E)、IL-6(图 3F)、IL-7(图 3G)、IL-10(图 3H)、IL-12(图 3I), 均无明显差异, 提示小鼠肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对上述血清细胞因子无显著影响。

2.4 肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对肠黏膜免疫细胞及细胞因子的影响

与 BALB/c 鼠比, *Tlr4*^{fl/fl} cre W 鼠肠黏膜主要相关免疫细胞包括 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、巨噬细胞、NK 细胞及树突状细胞, 数量和比例无显著性差异(图 4A~4F); 与 BALB/c 鼠比, *Tlr4*^{fl/fl} cre T 鼠肠黏膜 CD4⁺T 和 $\gamma\delta$ T 细胞数量和比例显著降低, 其余 4 种免疫细胞无差异性改变(图 4A, 4C)。

肠黏膜细胞因子包括 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-10, BALB/c、*Tlr4*^{fl/fl} cre W 及 *Tlr4*^{fl/fl} cre T 三组间相比无显著性差异(图 4G~4N)。

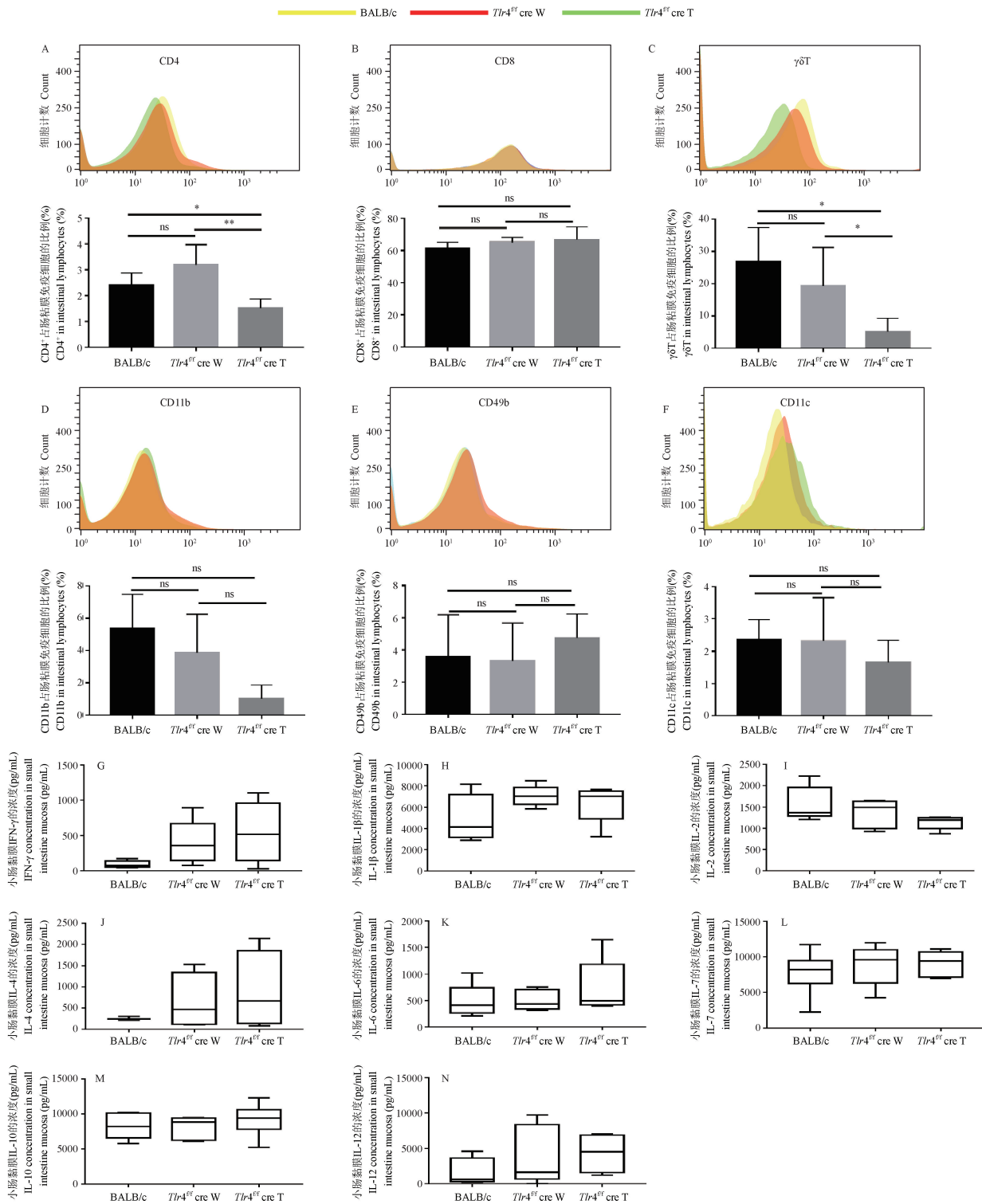


注: A: 脾淋巴细胞刺激指数柱状图; B ~ I: 血清细胞因子浓度 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12。

图 3 肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对脾淋巴细胞增殖及血清细胞因子的影响

Note. A. The stimulation index of splenic lymphocyte proliferation. B ~ I. Serum cytokine concentrations IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12.

Figure 3 Changes of effects of *Tlr4* specific knockout of intestinal epithelium on splenic lymphocyte proliferation and serum cytokines



注: A ~ F: 肠黏膜 CD4⁺、CD8⁺、γδT 淋巴细胞及肠黏膜巨噬细胞、NK 细胞、肠黏膜树突状细胞; G ~ N: 肠黏膜细胞因子浓度如 IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12。

图 4 肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对肠黏膜免疫细胞及细胞因子的影响

Note. A ~ F. Intestinal mucosa CD4⁺、CD8⁺、γδT lymphocytes and macrophages, NK, dendritic cell in intestinal mucos. G ~ N. The concentrations of cytokines in the intestinal mucosa such as IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12.

Figure 4 Changes of effects of *Tlr4* specific knockout of intestinal epithelium on intestinal mucosal immune cells and cytokines

3 讨论

肠上皮 TLR4 的过度激活不仅引起肠道疾病,同时与肿瘤、代谢综合征的发生密切相关^[11],目前大多数研究采用的都是小分子抑制剂或全身敲除的方式来抑制 TLR4 的激活,具有器官靶向性差的局限性^[12-13],不能准确的阐述肠上皮 TLR4 在疾病中的作用。因此本研究利用 CRISP/Cas9 技术成功构建了肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除基因鼠(*Tlr4*^{fl} cre T),评估其免疫特征,为研究肠上皮 TLR4 在疾病中的作用以及临床治疗提供新的手段。实验结果显示,除 *Tlr4*^{fl} cre T 基因鼠肠黏膜局部 CD4⁺T 淋巴细胞及 $\gamma\delta$ T 细胞比例明显下降以外,在一般生物学特征、繁育能力、子代存活率以及免疫特征方面 *Tlr4*^{fl} cre T 相较于 BALB/c 均无显著性改变,因此我们猜测 TLR4 的表达与 CD4⁺T 及 $\gamma\delta$ T 细胞数量存在密切联系,并进行了相关文献调研及实验研究。

文献表明:肠黏膜淋巴细胞的募集受肠上皮 TLR4 的调控,且 CD4⁺T 细胞的数量与 TLR4 密切相关,如在新生儿坏死性小肠结肠炎中,肠上皮 TLR4 激活导致同源趋化因子配体 25 大量分泌,进而募集更多 CD4⁺T 细胞到病变部位,导致其病情的加重^[14]。肠上皮细胞 TLR4 信号通路的激活,释放单核细胞趋化蛋白-1 和人中性粒细胞趋化因子-1,显著上调肠黏膜 CD4⁺T 淋巴细胞比例,增强肠黏膜免疫^[15]。正常生理状态下,肠上皮 TLR4 感受肠道微生态的动态变化,从而维持肠黏膜 CD4⁺T 细胞动态平衡^[16]。通过实验,认为特异性敲除肠上皮 *Tlr4* 基因,导致其无法感受肠道微生态信号,可能是导致肠黏膜 CD4⁺T 淋巴细胞显著减少的主要原因。肠上皮与 $\gamma\delta$ T 细胞的相互作用对于肠黏膜免疫的稳态至关重要。肠上皮 $\gamma\delta$ T 可调节和修复上皮屏障,调控肠上皮细胞生长和分化都具有重要影响^[17]。此外,肠黏膜局部细胞因子如 IL-1 α 、IL-15、IL-18、IL-21、IL-7 等,对于肠上皮 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖至关重要^[18-20],前期研究表明,肠上皮 TLR4/MyD88 非依赖通路的激活可以促进肠黏膜 IL-7 水平显著增高^[21]。本研究结果显示 *Tlr4*^{fl} cre T 小鼠的肠黏膜 $\gamma\delta$ T 显著减少,肠黏膜细胞因子的水平无显著性差异。考虑肠黏膜 $\gamma\delta$ T 细胞数量受到多种复杂因素的影响,并非受肠黏膜细胞因子单因素造成肠黏膜 $\gamma\delta$ T 的数量减少。因此在未来的研究中我们将继续深入探索,明确其具体机制。

肠黏膜免疫系统是中药发挥免疫药效、调节人体免疫功能的重要途径,同时中药大分子如蛋白质、多肽、多糖等依赖于菌群的分解发挥效用,如甘草多糖通过调节肠道菌群、激活肠黏膜免疫发挥抑制荷瘤鼠移植瘤增长的作用^[22],然而作为识别肠道菌群和调节肠黏膜稳态的肠上皮 TLR4 在其中的作用机制,尚不明了。后续研究将利用 *Tlr4*^{fl} cre T 基因鼠,探讨口服生物利用度极低的中药多糖抑制皮下移植瘤的作用机制,并进一步明确肠上皮 TLR4 信号通路的角色作用。鉴于肠上皮 TLR4 的激活在肠道疾病、肿瘤、代谢性疾病等密切相关,通过构建肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除小鼠,为研究其机制、治疗方法提供技术支持。

参 考 文 献 (References)

- [1] Zhou LT, Zheng DC, Wang SY, et al. Genetic association of Toll-like receptor 4 gene and coronary artery disease in a Chinese Han population [J]. Springerplus, 2016, 5(1): 1533.
- [2] 李嘉慧, 王欣佩, 冷静. TLR4/NF- κ B 参与动脉粥样硬化发生发展机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 137-142.
Li JH, Wang XP, Leng J. The mechanism of TLR4/NF- κ B in atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 137-142.
- [3] Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines [J]. J Immunol, 2002, 168(2): 554-561.
- [4] Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis [J]. Cell, 2004, 118(2): 229-241.
- [5] 张杰, 李红, 王进海, 等. 肠道微生态对腹泻型肠易激综合征的影响及其作用机制探讨 [J]. 世界临床药物, 2019, 40(5): 340-346.
Zhang J, Li H, Wang JH, et al. The effect and mechanism of intestinal microbiota in the pathogenesis of diarrhea type irritable bowel syndrome [J]. World Clin Drug, 2019, 40(5): 340-346.
- [6] 朱瑞齐, 庄培丽, 周璐, 等. TLR4/MyD88/NF- κ B 在克罗恩病结肠组织的表达及临床意义 [J]. 中国现代医生, 2021, 59(29): 17-20, 193.
Zhu RQ, Zhuang PL, Zhou L, et al. Expression and clinical significance of TLR4/MyD88/NF- κ B in the colonic tissues of patients with Crohn's disease [J]. Chin Modern Doctor, 2021, 59(29): 17-20, 193.
- [7] Shi YJ, Zhao QQ, Liu XS, et al. Toll-like receptor 4 regulates spontaneous intestinal tumorigenesis by up-regulating IL-6 and GM-CSF [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 385-397.
- [8] Perez-Pardo P, Dodiya HB, Engen PA, et al. Role of TLR4 in

- the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice [J]. Gut, 2019, 68(5): 829-843.
- [9] Cao J, Zhang HH, Yang ZM, et al. Effect of dehydroepiandrosterone on the immune response and gut microbiota in dextran sulfate sodium-induced colitis mice [J]. Mol Immunol, 2020, 118(2): 60-72.
- [10] Zhu Y, Cui G, Miyauchi E, et al. Intestinal epithelial cell-derived IL-15 determines local maintenance and maturation of intraepithelial lymphocytes in the intestine [J]. Int Immunol, 2020, 32(5): 307-319.
- [11] Burgueño JF, Abreu MT. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(5): 263-278.
- [12] Graças JP, Ranocha P, Vitorello VA, et al. The class III peroxidase encoding gene *AtPrx62* positively and spatiotemporally regulates the low pH-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* roots [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7191.
- [13] Islam K. The bump-and-hole tactic: expanding the scope of chemical genetics [J]. Cell Chem Biol, 2018, 25(10): 1171-1184.
- [14] Egan CE, Sodhi CP, Good M, et al. Toll-like receptor 4-mediated lymphocyte influx induces neonatal necrotizing enterocolitis [J]. J Clin Invest, 2016, 126(2): 495-508.
- [15] Xie SZ, Shang ZZ, Li QM, et al. *Dendrobium huoshanense* polysaccharide regulates intestinal lamina propria immune response by stimulation of intestinal epithelial cells via toll-like receptor 4 [J]. Carbohydr Polym, 2019, 222(2): 115028.
- [16] 杨雪, 赵旭晶. 奥美拉唑联合肠道微生态调节剂治疗新生儿坏死性小肠结肠炎的疗效分析 [J]. 河北医学, 2022, 28(3): 472-477.
- Yang X, Zhao XJ. An analysis of the efficacy of omeprazole combined with intestinal microecological regulator in the treatment of neonatal necrotizing enterocolitis [J]. Hebei Med, 2022, 28(3): 472-477.
- [17] Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(13): 6147-6151.
- [18] Lodolce JP, Boone DL, Chai S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation [J]. Immunity, 1998, 9(5): 669-676.
- [19] Tsuda J, Li W, Yamanishi H, et al. Involvement of CD56^{bright}CD11c⁺ cells in IL-18-mediated expansion of human $\gamma\delta$ T cells [J]. J Immunol, 2011, 186(4): 2003-2012.
- [20] 陈永强, 郑璐, 王鹏, 等. 糖原合酶激酶-3 β 抑制剂 TWS119 联合细胞因子促进 CD45RA⁺CD62L⁺ $\gamma\delta$ T 细胞分化及功能 [J]. 免疫学杂志, 2021, 37(11): 974-979.
- Chen YQ, Zheng L, Wang P, et al. Glycogen synthase kinase 3 β inhibitor TWS119 combined with cytokines promotes the differentiation and function of CD45RA⁺CD62L⁺ $\gamma\delta$ T cells [J]. Immunol J, 2021, 37(11): 974-979.
- [21] 王丽, 赵颖, 崔换天, 等. 基于 IL-7 的甘草多糖抗肿瘤机制的研究 [J]. 天津中医药, 2016, 33(6): 373-377.
- Wang L, Zhao Y, Cui HT, et al. Study on the anti-tumor mechanism of Gancao polysaccharide on production of IL-7 [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2016, 33(6): 373-377.
- [22] Zhang XY, Zhao SW, Song XB, et al. Inhibition effect of glycyrrhiza polysaccharide (GCP) on tumor growth through regulation of the gut microbiota composition [J]. J Pharmacol Sci, 2018, 137(4): 324-332.

[收稿日期] 2022-03-15